



⑪ Numéro de publication:

0 207 039

A1

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 86870068.3

⑮ Int. Cl.4: A23L 2/34 , A23L 3/34 ,
A23C 9/12 , A23F 5/14 ,
A61K 7/28 , A23G 3/00 ,
C12N 9/00 , C12H 1/00

⑭ Date de dépôt: 20.05.86

⑬ Priorité: 22.05.85 LU 85910

⑯ Demandeur: OLEOFINA S.A.
Rue de la LOI, 15 (Bte 104)
B-1040 Bruxelles(BE)

⑭ Date de publication de la demande:
30.12.86 Bulletin 86/52

⑰ Inventeur: Prieels, Jean-Paul
7, avenue de Février
B-1200 Bruxelles(BE)
Inventeur: Maschelein, Charles
Foetstraets 72
B-1180 Bruxelles(BE)
Inventeur: Heilporn, Marc
83, rue de l'Aqueduc
B-1050 Bruxelles(BE)

⑭ Etats contractants désignés:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

⑰ Mandataire: Detrait, Jean-Claude
LABOFINA S.A. Zoning Industriel
B-6520 Feluy(BE)

⑯ Procédé pour éliminer l'oxygène dans les aliments et les boissons, et composition enzymatique utilisée à cet effet.

⑯ On décrit un procédé pour empêcher l'autoxydation des substances alimentaires pouvant se dégrader par oxydation avec l'oxygène moléculaire et/ou radicalaire qui consiste à ajouter à ces substances une composition enzymatique comprenant une oxydase, le substrat correspondant à l'oxydase, la catalase et la superoxyde dismutase.

EP 0 207 039 A1

PROCEDE POUR ELIMINER L'OXYGENE DANS LES ALIMENTS ET LES BOISSONS ET COMPOSITION ENZYMATIQUE UTILISEE A CET EFFET.

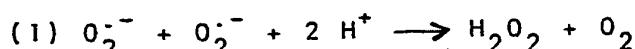
La présente invention se rapporte à un procédé pour éliminer l'oxygène présent dans les aliments ou les boissons. En particulier, la présente invention concerne un procédé pour éliminer aussi bien l'oxygène moléculaire que l'oxygène radicalaire présent dans les boissons et plus spécialement dans les boissons à pH acide comme la bière. La présente invention se rapporte également à une composition enzymatique, contenant de la superoxyde dismutase, qui est utilisée pour réaliser le procédé de l'invention.

Dans le domaine de la conservation des aliments et des boissons en particulier, les effets néfastes de l'oxygène présent en solution aqueuse sont bien connus. En l'occurrence, ces effets se traduisent par des changements de coloration et de changements de goût. Ces effets sont dûs principalement aux radicaux libres formés lors de la réaction de l'oxygène avec des solutés réducteurs. Afin de réduire ces effets néfastes de l'oxygène, on utilise des agents anti-oxydants.

On connaît divers systèmes qui sont utilisés, pour éliminer l'oxygène des aliments ou des boissons comme par exemple la catalase et les oxydo-réductases qui sont utilisés pour protéger les aliments contre les effets de dégradation dûs à l'oxygène; ce système permet notamment de réduire fortement la concentration en oxygène dissous, mais malheureusement il n'a aucun effet sur l'oxygène présent sous forme radicalaire, qui est responsable de mécanismes de dégradation.

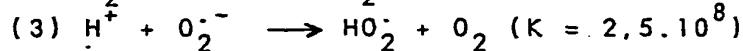
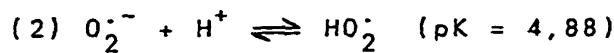
On connaît également des systèmes faisant appel à la superoxyde dismutase seule, comme décrit notamment dans le brevet US 3.920.521. Cependant, la superoxyde dismutase ne consomme pas réellement l'oxygène et elle n'empêche pas toutes les réactions avec les différents réducteurs du milieu, puisque selon la réaction (1), elle capte l'ion superoxyde et reforme de l'oxygène.

20



De plus, il est bien connu que la superoxyde dismutase n'a qu'un faible pouvoir anti-oxydant à pH inférieur à 5 et ceci est dû à l'existence éphémère du radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ à pH acide comme le montrent les équations (2) et (3).

30



A l'heure actuelle, pour la conservation des aliments et en particulier des boissons, soit que l'on quenche l'oxygène moléculaire, soit que l'on ajoute un anti-oxydant qui aura pour effet de maintenir la teneur en oxygène à une certaine teneur que l'on s'impose.

Or il semble nécessaire pour améliorer considérablement le facteur conservation de capter à la fois l'oxygène moléculaire et l'oxygène radicalaire, de manière à écarter tout risque de dégradation oxydative au milieu.

La présente invention a pour but de remédier aux inconvénients mentionnés ci-dessus.

La présente invention a pour objet un procédé qui permette d'éliminer la présence d'oxygène tant sous forme moléculaire que sous forme radicalaire, dans les aliments, les boissons et en particulier dans les boissons dont le pH est inférieur à 5.

La présente invention a également pour objet une composition antioxydante contenant de la superoxyde dismutase, qui peut être utilisée dans le procédé de l'invention.

50

Le procédé de la présente invention pour éliminer l'oxygène tant moléculaire que radicalaire de substances alimentaires pouvant se dégrader par oxydation, est caractérisé en ce que l'on ajoute à ces substances une composition enzymatique comprenant une oxydase et son substrat, la catalase et la superoxyde dismutase.

La Demanderesse a trouvé d'une manière inattendue qu'en ajoutant à des substances alimentaires et particulièrement à des boissons dont le pH est acide, une composition enzymatique comprenant à la fois une oxydase et son substrat, la catalase ainsi que la superoxyde dismutase, on obtient une durée de conservation de ces substances nettement améliorée concrétisée par une teneur en oxygène considérablement réduite dans le milieu.

Ceci est d'autant plus inattendu qu'il est bien connu que l'effet anti-oxydant de la superoxyde dismutase n'est que très éphémère à faible pH compte tenu de la constante de vitesse de la réaction (3) mentionnée ci-avant.

Parmi les substances alimentaires qui peuvent être traitées, on peut notamment citer la mayonnaise, les pâtes de dentifrice, les chewing gums, la poudre de lait, les cafés solubles et autres analogues.

Le procédé de l'invention est particulièrement approprié pour traiter les boissons comme la bière dont le pH est voisin de 4, les jus de fruits ou de légumes et autres analogues.

La composition enzymatique utilisée dans le procédé de l'invention comprend nécessairement une oxydase et son substrat, sauf si ce dernier est déjà présent dans le milieu, la catalase, et la superoxyde dismutase. On peut dire que l'utilisation conjointe de ces trois enzymes donne lieu à un effet de synergie du point de vue des propriétés anti-oxydantes. En effet, lorsque ces enzymes sont utilisées seules ou même en mélange deux à deux, les résultats sont loin d'être probants, et n'incitent pas l'homme de l'art à les combiner.

La composition enzymatique utilisée dans le procédé de l'invention comprend tout d'abord une oxydase et son substrat. Comme oxydases appropriées, on peut utiliser la glucose oxydase, l'oxalate oxydase, la lactate oxydase, l'éthanol oxydase, l'ascorbate oxydase et des amino-acides oxydases; les substrats à utiliser sont évidemment le glucose, l'acide oxalique, l'acide lactique, l'éthanol, l'acide ascorbique et les aminoacides correspondants. Toutes ces oxydases sont disponibles commercialement, cependant pour des raisons de facilité, on préfère utiliser la glucose oxydase.

La quantité d'oxydase à mettre en œuvre est généralement comprise entre 0,1 et 1 ppm basé sur le milieu. Dans le cas où l'on utilise la glucose oxydase, on peut exprimer sa teneur en unités

Sorett et celle-ci est généralement comprise entre 25 et 100 unités Sorett/l de milieu. L'unité Sorett est la quantité d'enzyme qui consomme 10 ml d'oxygène par minute à pH 5,6, en présence de 3 % de glucose et d'air saturé en oxygène, à 30°C et en présence d'un excès de catalase. Les unités de concentration utilisées dans le présent texte sont exprimées en unités de poids par volume, par exemple $\mu\text{g/l}$ pour ppm.

Le substrat est introduit dans le milieu, sauf s'il y est déjà présent en quantités suffisantes, à raison de 0,05 à 2 % et de préférence de 0,1 à 1 % basé sur le milieu.

La deuxième enzyme utilisée dans la composition de l'invention est constituée par la catalase. La catalase est également une enzyme bien connue pour son action anti-oxydante lorsque utilisée avec une oxydase.

La catalase seule ou en mélange avec la superoxyde dismutase n'a pratiquement aucun effet antioxydant.

Selon le procédé de l'invention, on utilise la catalase à raison de 2.000 à 20.000 unités/litre de milieu et le plus souvent de 5.000 à 12.000 unités/litre de milieu. La catalase est disponible commercialement et dans certains cas, comme dans la glucose oxydase, elle y est déjà présente. Les unités de catalase sont des micromoles de produit formé (O_2) par ml, par minute et par mg de catalase.

La composition enzymatique de l'invention comprend également de la superoxyde dismutase.

On introduit de la superoxyde dismutase dans le milieu à raison de 0,3 à 1,5 ppm et de préférence de 0,5 à 1 ppm. La superoxyde dismutase utilisée dans la composition de l'invention peut provenir de toute source appropriée comme l'érythrocyte ou encore de souches bactériennes marines comme *Photobacterium Phosphoreum*, *Phosphoreum Leiognathi* et *Photobacterium Seapia*.

La Demanderesse a trouvé d'une manière inattendue que l'utilisation conjointe de ces trois enzymes permettait une élimination de l'oxygène tant moléculaire que radicalaire de loin supérieure à ce que est obtenu avec les systèmes usuels. De plus, le procédé et la composition de l'invention sont particulièrement applicables aux boissons à faible pH, notamment inférieur à 5, comme la bière.

On a d'ailleurs remarqué qu'avec la composition de l'invention, on réduit la concentration en oxygène dissous dans la bière à quelques dizaines de ppb seulement, alors qu'avec les systèmes anti-oxydants usuels comme l'acide ascorbique, l'oxygène résiduel reste à un niveau compris entre 200 et 500 ppb.

Les exemples suivants servent à mieux illustrer le procédé et la composition de l'invention, mais sans pour autant en limiter la portée.

Exemple 1

On a introduit dans une bouteille de bière de 25 cl de pH = 4,2 une composition enzymatique comprenant de la glucose oxydase, le glucose comme substrat, la catalase et la superoxyde dismutase.

On a utilisé la glucose oxydase (GOD) à raison de 0,5 ppm par rapport au milieu. On a ensuite ajouté du glucose à raison de 0,1 % basé sur le milieu ainsi que de la superoxyde dismutase (SOD) à raison de 1 ppm par rapport au milieu.

Après avoir introduit la composition enzymatique dans la bière, on a fermé la bouteille, et on a étudié la résistance du milieu au vieillissement, en portant la bière à une température de 50°C pendant 40 heures.

On a mesuré la résistance au vieillissement par le test à l'acide thiobarbiturique. Ce test permet de déterminer par une méthode colorimétrique la quantité de produits carbonylés formés par oxydation de la bière. Après refroidissement de la bière, on en prend un échantillon de 5 ml que l'on introduit dans un tube de 15 ml contenant 2 ml d'une solution contenant 0,33 % d'acide thiobarbiturique dans un mélange 50/50 acide acétique-eau. Après mélange, on porte le tube à 60 °C pendant 1 heure, on refroidit et on lit l'absorbance à 530 nm. L'absorbance est indiquée en % de la valeur la plus élevée prise égale à 100 %, une valeur élevée étant significative d'une meilleure résistance.

Avec la composition de l'invention, on a obtenu une valeur de 100%.

A titre de comparaison, on a déterminé la résistance d'une bière à laquelle on a ajouté uniquement la GOD, le glucose et la catalase, dans les mêmes proportions que ci-dessus. Comme contrôle, on a également testé une bière qui a été aérée. Les résultats furent les suivants:

-contrôle : 37,11 % -GOD + glucose + catalase : 84,25 %.

Ceci montre qu'en appliquant le procédé de l'invention, on obtient une bière ayant une beaucoup plus longue durée de vie.

Exemple 2

On a introduit dans une bouteille de bière de 25 cl de pH = 4,2 une composition enzymatique comprenant de la glucose oxydase à raison de 0,5 ppm basée sur le milieu, du glucose à raison de 0,1 % basé sur le milieu et 0,5 ppm de SOD par rapport au milieu.

Après avoir introduit cette composition dans la bière, on a fermé la bouteille et on a étudié le pouvoir réducteur de la bière, en portant la bière à une température de 50°C pendant 40 heures.

On détermine le pouvoir réducteur de la bière en mesurant la réduction de complexe de dipyridyle/Fe³⁺ (incolore) en dipyridyle/Fe²⁺ - (rouge) au moyen des substances réductrices de la bière.

On mesure l'absorbance (en %) à 510 nm. La valeur de absorbance de la bière fraîche non aérée est prise comme égale à 100 %.

Avec la composition de l'invention, on a obtenu une absorbance de 93,3 %.

A titre de comparaison, on a déterminé le pouvoir réducteur d'une bière à laquelle on a ajouté uniquement la GOD, le glucose et la catalase dans les mêmes proportions que ci-dessus.

Pour contrôle, on a également pris un échantillon aéré. Les résultats furent les suivants:

-contrôle : 85,9 % -GOD + glucose + catalase : 88,6 %

Ceci montre que la bière traitée avec la composition de l'invention a un meilleur pouvoir réducteur.

Exemple 3

On a testé différents systèmes enzymatiques et autres à base d'acide ascorbique pour éliminer l'oxygène de la bière, responsable de perte de saveur et autres réactions de dégradation.

On a ainsi ajouté diverses compositions, reprises dans le tableau I, à différentes bouteilles de bière de 25 cl, bière dont le pH était de 4,2.

Après avoir injecté 10 ml d'air bouteille, on a ajouté la composition anti-oxydante, on a refermé la bouteille, on l'a agitée à 100 t/min à une température de 25°C pendant 64 heures.

On a déterminé la teneur en oxygène dissous dans la bière. Tous les résultats sont indiqués au tableau I.

TABLEAU I

<u>Essai</u>	<u>Composition</u>	<u>Teneur en O₂ dissous</u> (ppm)
1	Contrôle - aéré	3,19
2	GOD (50 unités Sorett/l) + catalase (10 ⁴ U.) + glucose (à 0,25 %)	0,05
3	Catalase (10 ⁴ U)	3,73
4	SOD 0,5 ppm	3,55
5	SOD (0,5 ppm) + catalase (10 ⁴ U)	3,61
6	GOD (50 unités Sorett) + catalase (10 ⁴ U) + 0,5 % glucose + SOD 0,5 ppm	0,00
7	Acide ascorbique (30 ppm)	2,86

Cet exemple montre que seule la composition de l'invention montre une élimination complète de l'oxygène dissous.

Revendications

1) Procédé pour empêcher l'auto-oxydation des substances alimentaires pouvant se dégrader par oxydation avec l'oxygène moléculaire et/ou radicalaire, caractérisé en ce que l'on ajoute à ces substances alimentaires une composition enzymatique comprenant une oxydase et son substrat, si ce dernier n'est déjà pas présent dans le milieu, la catalase et la superoxyde dismutase.

2) Procédé selon la revendication 1 selon lequel les substances alimentaires sont choisies principalement parmi la mayonnaise, les pâtes de dentifrice, les chewing-gums, la poudre de lait, les cafés solubles, et les boissons comme la bière, les jus de fruits et les jus de légumes.

3) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2 caractérisé en ce que l'on utilise une oxydase choisie dans le groupe comprenant la glucose oxydase, l'oxalate oxydase, la lactate oxy-

dase, l'éthanol oxydase, l'ascorbate oxydase et les amino acides oxydases, et le substrat correspondant choisi parmi le glucose, l'acide oxalique, l'acide lactique, l'éthanol, l'acide ascorbique et les amino acides correspondants.

4) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que l'on ajoute une oxydase à raison de 0,1 à 1 µg/l de milieu, le substrat à raison de 0,05 à 2 % basé sur le milieu, la catalase à raison de 2.000 à 20.000 unités/l de milieu et de préférence à raison de 5.000 à 12.000 unités, et la superoxyde dismutase à raison de 0,3 à 1,5 µg et de préférence à raison de 0,5 à 1 µg/l de milieu.

5) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'on ajoute à de la bière, une composition enzymatique comprenant de 0,1 à 1 µg/litre de bière de glucose oxydase, de 0,05 à 2 % de glucose par rapport à la bière, de 2.000 à 20.000 unités de catalase par l de bière et de 0,3 à 1,5 µg/l de bière de superoxyde dismutase.

6) Composition enzymatique pour éliminer l'oxygène moléculaire et/ou radicalaire de substances alimentaires pouvant se dégrader par oxyda-

tion, caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,1 à 1 $\mu\text{g/l}$ de milieu d'une oxydase, de 0,05 à 2% basé sur le milieu de substrat correspondant à l'oxydase, de 2.000 à 20.000 unités/l de milieu de catalase et de 0,3 à 1,5 $\mu\text{g/l}$ de milieu de superoxyde dismutase.

7) Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que les substances alimentaires pouvant se dégrader par oxydation sont choisies principalement parmi la mayonnaise, les pâtes dentifrice, les chewing-gums, la poudre de lait, les cafés solubles et les boissons comme la bière, les jus de fruits et de légumes.

8) Composition selon l'une quelconque des revendications 6 et 7 caractérisée en ce que l'oxydase est choisie parmi la glucose oxydase, l'oxalate

oxydase, la lactate oxydase, l'éthanol oxydase, l'ascorbate oxydase et les aminoacides oxydases, et en ce que le substrat correspondant est choisi parmi le glucose, l'acide oxalique, l'acide lactique, l'éthanol, l'acide ascorbique et les aminoacides correspondants.

9) Composition selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 caractérisée en ce qu'elle comprend de la bière comme substance alimentaire pouvant se dégrader par oxydation, et une composition enzymatique comprenant de 0,1 à 1 $\mu\text{g/l}$ de bière de glucose oxydase, de 0,05 à 2 % basé sur la bière de glucose comme substrat, de 2.000 à 20.000 unités/l de bière, de catalase et de 0,3 à 1,5 $\mu\text{g/l}$ de bière de superoxyde dismutase.

20

25

30

35

40

45

50

55

6



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
D, A	US-A-3 920 521 (A.M. MICHELSON et al.) * revendications 1, 8, 13 *	1, 7	A 23 L 2/34 A 23 L 3/34 A 23 C 9/12 A 23 F 5/14 A 61 K 7/28 A 23 G 3/00 C 12 N 9/00 C 12 H 1/00
A	DE-A-3 204 284 (G. KOHLBECKER et al.) * page 6, alinéa 2 - page 7, alinéa 1, revendications 1-4 *	1, 7	
A	DE-A-3 030 185 (G. KOHLBECKER et al.) * revendications 1-6 *	1, 7	
A	DE-A-2 946 642 (NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPAST-NATUURWETENSCHAPPELIJK) * page 11, alinéa 3 *	1, 7	
	-----		• DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
			A 23 L 2/00 A 23 L 3/00 A 23 C 9/00 A 23 F 5/00 A 61 K 7/00 A 23 G 3/00 C 12 N 9/00 C 12 H 1/00
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche BERLIN	Date d'achèvement de la recherche 13-08-1986	Examinateur SCHULTZE D	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons	
X : particulièrement pertinent à lui seul		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
Y : particulièrement pertinent en combiné avec un autre document de la même catégorie		E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date	
A : arrrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgué non écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	